

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
8. Jg., S. 221—224, Mai 1970

Gaschromatographische Bestimmung von Testosteron im Urin¹⁾

Von H.-CH. CURTIUS, M. ZACHMANN und M. MÜLLER

Aus der Medizinisch-Chemischen Abteilung der Universitäts-Kinderklinik Zürich (Direktor: Prof. Dr. A. Prader)

(Eingegangen am 11. November 1969)

Es wird eine gaschromatographische Methode zur Bestimmung von Testosteronglucuronid im Urin beschrieben. Die Methode umfaßt Hydrolyse mit β -Glucuronidase, Extraktion mit Äther, Vorreinigung mit Kolonnen- und Dünnschichtchromatographie, Silylierung und Gaschromatographie. Die Verluste während der Vorreinigung werden durch Zugabe von [³H]-Testosteron als interner Standard kompensiert.

Die Werte gesunder Versuchspersonen und Patienten mit endokrinen Störungen sind tabellarisch zusammengefaßt.

The Gas chromatographic determination of urinary testosterone

A method for the determination of testosterone glucuronide in urine using gas-liquid chromatography is described. The method consists of hydrolysis with β -glucuronidase, extraction with ether and prepurification on an alumina column and thin-layer chromatography. Gas-liquid chromatography of the trimethylsilyl ether derivative is then performed.

Losses during prepurification are compensated by adding [³H]-testosterone as internal standard. Examples of values of normal subjects and of patients with endocrine disorders are presented.

Seit Beginn der sechziger Jahre wurden mehrere Methoden zur Bestimmung von Testosteron im Urin veröffentlicht (1—20). Unter den kolorimetrischen Methoden hat sich diejenige von CAMACHO und MIGEON (2) bewährt. Zur Erfassung geringer Testosteronmengen, wie sie bei pathologischen Zuständen und vor der Pubertät auftreten, ist ihre Empfindlichkeit jedoch zu gering. Eine fluorimetrische Methode wurde von GRAEF und Mitarbeitern (15) beschrieben. Versuche mit der Proteinbindungsmethode sind zwar erfolgversprechend für die Praxis, aber bis heute noch zu unspezifisch und in niederen Konzentrationsbereichen ungenau (21). Die Methode von SANDBERG und Mitarbeitern (7), die auf der gaschromatographischen Bestimmung nach Hydrolyse und Vorreinigung nach der Methode von CAMACHO und MIGEON (2) beruht, hat sich als zuverlässig erwiesen (22). Die Technik der Gradienten-Elution gestaltet dieses Verfahren jedoch relativ zeitraubend. Auch die gaschromatographische Methode von WATSON (23) bedient sich der Gradienten-Elution.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine spezifische und empfindliche Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von Testosteron im Urin zu beschreiben, die besonders zur Bestimmung geringer Konzentrationen geeignet und relativ wenig aufwendig ist.

Methodik

Geräte

Gaschromatograph „F 20“ der Fa. Perkin-Elmer mit Flammenionisationsdetektor.
GC/MS Kombination LKB „9000“.
Liquid Scintillation Spektrometer Modell „3324 Tri-Carb“ der Fa. Packard.
UV-Lampe 253 nm.

Chromatographierohr, verjüngt von 350 × 15 mm auf 140 × 8 mm, mit Hahn, 3 mm Bohrung.

Chemikalien

Aceton p. a., Merck, Art.-Nr. 14
Äthylalkohol für UV-Spektroskopie, Fluka, Art.-Nr. 02850
Aluminiumoxid Al₂O₃, Woelm neutral, Aktivitätsstufe I, Woelm, Eschwege
Benzol purum, thiophenfrei, Ph. Helv. I, Fluka, Art.-Nr. 12560 (destillieren)
Chloroform CHCl₃ p. a., Merck, Art.-Nr. 2445
Diäthyläther puriss p. a., Fluka, Art.-Nr. 31690
Essigsäureäthylester p. a., Merck, Art.-Nr. 9623 (destillieren)
 β -Glucuronidase (bakteriell) Typ I, Sigma, Art.-Nr. 105—8
Hexamethyldisilazan purum, Fluka, Art.-Nr. 52620
Kaliumdihydrogenphosphat KH₂PO₄, Merck, Art.-Nr. 4873
Kieselgel HF 254 nm nach STAHL, Merck, Art.-Nr. 7739
Natriumhydroxid NaOH p. a., Merck, Art.-Nr. 6498
Natriumsulfat Na₂SO₄ wasserfrei p. a., Merck, Art.-Nr. 6649
Quarzsand 0,1—0,3 mm Ø
Salzsäure 32% HCl p. a., Merck, Art.-Nr. 319
Stigmasterin, Fluka, Art.-Nr. 57399
Testosteron für biochem. Zwecke, Merck, Art.-Nr. 8973
Testosteron-[1,2-³H] 0,2 mC, 15000 mC/mMol, TRC, Amersham
Trimethylchlorsilan puriss, Fluka, Art.-Nr. 92360
POPOP = 1,4-Di(5'-phenyl-oxazol-2'-yl)benzol, Packard
PPO = 2,5-Diphenyloxazol, Packard

Reagenzien

Phosphatpuffer: pH 6,2; 0,5M; 60 g KH₂PO₄ in 500 ml H₂O lösen, mit 2N NaOH auf pH 6,2 einstellen, auf 1 l auffüllen mit H₂O.
Natronlauge: etwa 1N; 40 g NaOH werden in 1 l Wasser gelöst.
Aluminiumoxid desaktiviert: 0,6 ml H₂O mit 10 g Al₂O₃ während 10 Min. schütteln. Erst nach einstündigem Stehenlassen verwenden.
Elutionsmittel Säulenchromatographie: 0,1% Äthanol in Benzol; 0,25% Äthanol in Benzol.
Lösungen für Aktivitätszählung: Lösung I: 5 g PPO, 300 mg POPOP in 1 l Toluol; Lösung II: 3,5 g PPO, 150 mg POPOP, 50 g Naphthalin in 500 ml Dioxan.

Lösung [³H]-Testosteron in Äthanol: 75000 Imp./Min. [³H]-Testosteron/1 ml Äthanol.

¹⁾ Mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Kredit Nr. 36868.

Stigmastereinlösung: 4 mg Stigmasterein in 100 ml Äthanol (100 µl = 4 µg).

Testosteronlösung: 5 mg Testosteron in 100 ml Äthanol.

Testosteron-Eichkurve: (bei jeder Gaschromatographieserie)

10 µg Testosteron	4 µg Stigmasterein
5 µg Testosteron	4 µg Stigmasterein
2 µg Testosteron	4 µg Stigmasterein
0,5 µg Testosteron	4 µg Stigmasterein

Arbeitsvorschrift

Hydrolyse mit β -Glucuronidase

Einzusetzende Urinmenge:

Männer	$\frac{1}{5}$ der 24 Stdn.-Menge
Frauen	$\frac{1}{3}$ der 24 Stdn.-Menge
Kinder (bis Pubertät)	$\frac{3}{5}$ der 24 Stdn.-Menge

Die jeweilige Urinmenge wird durch Zugabe von Phosphatpuffer auf pH 6,2 gebracht ($\frac{1}{5}$ des Urinvolumens). Anschließend werden 100 Einheiten β -Glucuronidase/ml Urin zugegeben. Das Gemisch wird 72 Stdn. bei 37° im Wärmeschrank inkubiert, zur Verhinderung von bakterieller Zersetzung werden 3 Tropfen Chloroform zugefügt. Anschließend gibt man 0,2 ml [3 H]-Testosteron zu. Von 0,2 ml [3 H]-Testosteron wird der 100%-Wert im „liquid scintillation counter“ ermittelt.

Extraktion

Das Hydrolysat wird 3mal mit gleichen Volumenteilen Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden anschließend 3mal mit 0,1 Volumenteilen 1N NaOH ausgeschüttelt und mit H₂O neutral gewaschen. Der Äther wird mit Natriumsulfat getrocknet und am Vakuum eingedampft. Restliches Wasser wird mit Äthylalkohol azeotrop abdestilliert.

Aluminiumoxid-Chromatographie

4 g desaktiviertes Aluminiumoxid werden in Benzol auf die Kolonne gegeben. Der getrocknete Ätherextrakt wird in 5 ml Benzol gelöst und auf die Kolonne überführt. Nach einmaligem Waschen mit 5 ml Benzol-Äthanol (99,9:0,1) chromatographiert man zunächst mit 10 ml Benzol-Äthanol (99,9:0,1 v/v) (= Fraktion 1a) und anschließend nochmals mit 10 ml Benzol-Äthanol (99,9:0,1 v/v) (= Fraktion 1b). Daraufhin wird zunächst mit 30 ml Benzol-Äthanol (99,75:0,25 v/v) (= Fraktion 2a) und dann mit 15 ml dieser Mischung (= Fraktion 2b) und zuletzt nochmals mit 15 ml (= Fraktion 2c) chromatographiert. Alle Fraktionen werden in Meßzylindern aufgenommen, gemischt und $\frac{1}{20}$ des jeweiligen Volumens zur Aktivitätsmessung in den „liquid scintillation counter“ gegeben. Bei zu geringer Gesamtaktivität werden eventuell weitere Fraktionen à 20 ml mit Benzol-Äthanol (99,75:0,25 v/v) chromatographiert. Die Fraktionen 1a und 1b sollten kein [3 H]-Testosteron enthalten. In Fraktion 2a findet sich der Hauptanteil und eventuell in 2b noch eine geringere Menge. Diese aktiven Fraktionen werden vereinigt und eingedampft. Der Rückstand wird 3mal mit 2 ml Aceton in ein kleines Schliff-röhrchen überführt und das Lösungsmittel vorsichtig im Stickstoffstrom abgeblasen.

Messung der Radioaktivität

Der jeweilige Rückstand wird im Scintillatorfläschchen mit 0,2 ml 96proz. Äthanol, 5 ml Scintillatorflüssigkeit I und 0,5 ml Scintillatorflüssigkeit II versetzt und die jeweilige Radioaktivität gemessen.

Dünnschichtchromatographie

Das trockene Eluat wird in 100 µl Aceton gelöst und in einer 5 cm breiten Zone auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen. Nach zweimaligem Nachspülen mit 100 µl Aceton trägt man auf beiden Seiten der Platte je 10 µg Testosteron auf und entwickelt im

System CHCl₃-Äthylacetat (2:1 v/v) bei 4°. Das Fließmittel werden 15 cm hoch laufen gelassen. Die Platte wird anschließend unter der UV-Lampe bei 253 nm betrachtet und eine 16 mm breite Zone auf der Höhe des Testosterons markiert, das Kieselgel abgekratzt und in eine kleine Chromatographiesäule über 200 mg Quarzsand und Glaswolle eingefüllt und mit 5 ml Äther eluiert.

Vorbereitung der Proben für die Gaschromatographie und Radioaktivitätsmessung

Das getrocknete Eluat wird in 10 ml Aceton gelöst. Davon werden 1 ml für die Messung der Radioaktivität, 4 ml für die Gaschromatographie ohne internen Standard und 4 ml für die Gaschromatographie mit internem Standard (4 µg Stigmasterein) verwendet. Das Lösungsmittel in den einzelnen Gläschen wird vorsichtig unter Stickstoff abgeblasen. Die Proben für die Gaschromatographie werden etwa 10 Min. im Exsikkator über P₂O₅ getrocknet.

Silylierung

Die Proben für die Gaschromatographie werden in 100 µl Silylierungsgemisch gelöst (Überstand verwenden) und 1 Std. bei 60° inkubiert. Das Silylierungsgemisch wird im trockenen Stickstoffstrom abgeblasen und der Trockenrückstand erneut in 20 µl Silylierungsgemisch gelöst.

Gaschromatographie

Zur Gaschromatographie verwenden wir einen Perkin-Elmer Fraktometer (Modell „F 20“) mit Flammenionisationsdetektor.

Trennsäulenbedingungen

XE 60, 3%, 2 m, auf Gaschrom P (100–120 mesh); T_c = 215°, T_j = 270°; N₂ = 45 ml/Min.

Auswertung und Berechnung

Zur Berechnung verwendeten wir eine graphische Eichkurve (24). Anhand von Eichlösungen mit konstantem internem Standard (Stigmasterein), mit denen der ganze Analysengang durchgeführt wird, errechnet man einen Faktor (f):

$$f = \frac{F_x}{F_{St}} = \frac{(\text{Fläche Testosteron})}{(\text{Fläche Stigmasterein})}$$

(Fläche = Peakhöhe \times Peakbreite in der halben Höhe)

Auf der Abszisse trägt man die eingesetzte Menge, auf der Ordinate den errechneten Faktor f ab. In einem Chromatogramm mit unbekannten Mengen bestimmt man den Faktor f und liest auf der Eichkurve ab.

Resultate

Abbildung 1a zeigt das Gaschromatogramm eines Testgemisches und 1b das Gaschromatogramm eines Urinextraktes.

Einige Resultate sind in Tabelle 1 (gesunde Versuchspersonen) und Tabelle 2 (Patienten mit endokrinen Störungen) zusammengefaßt.

Tab. 1
Ausscheidung von Testosteronglucuronid bei gesunden Versuchspersonen

	\bar{x} (µg/24 Stdn.)	Bereich	n
Knaben			
0–4 Jahre	0,9	< 0,5–1,7	4
4–12 Jahre	1,4	< 0,5–3,3	6
12–18 Jahre	10,8	2,2–27,6	5
Männer			
18–38 Jahre	71,7	32,5–134,5	9
Frauen			
27–38 Jahre	9,4	7,3–12,7	3

Tab. 2

Ausscheidung von Testosteronglucuronid bei Patienten mit endokrinen Störungen

Alter in Jahren	Geschlecht	Diagnose	Testosteron $\mu\text{g}/24$ Stdn.
Erhöhte Werte			
5	♂	Idiopathische Pubertas praecox	38,8
16	♀	Adrenogenitales Syndrom (21-Hydroxylasedefekt) unbehandelt	135,0
29	♀	Hirsutismus	26,3
38	♀	Virilisierendes Nebennierenrindenadenom	28,2 47,6
Erniedrigte Werte			
9	♂	Anorchie	< 0,5
17	♂	Hodenatrophie nach doppelseitiger Hodentorsion	4,4
18	♂	Pubertas tarda	2,0
18	♂	Pubertas tarda	2,1

Tab. 3

Reproduzierbarkeit der Methode. Resultate von 5 Bestimmungen von Testosteronglucuronid im gleichen Urin eines Patienten mit adrenogenitalem Syndrom

1.	154,5 $\mu\text{g}/24$ Stdn.
2.	154,0 $\mu\text{g}/24$ Stdn.
3.	152,0 $\mu\text{g}/24$ Stdn.
4.	147,0 $\mu\text{g}/24$ Stdn.
5.	164,0 $\mu\text{g}/24$ Stdn.
Mittelwert:	$\bar{x} = 154,3 \mu\text{g}/24$ Stdn.
Standardabweichung:	$s = \pm 5,53$
Standardfehler des Mittels:	$\sigma = \pm 2,47$
Variationskoeffizient:	$V = 3,6\%$

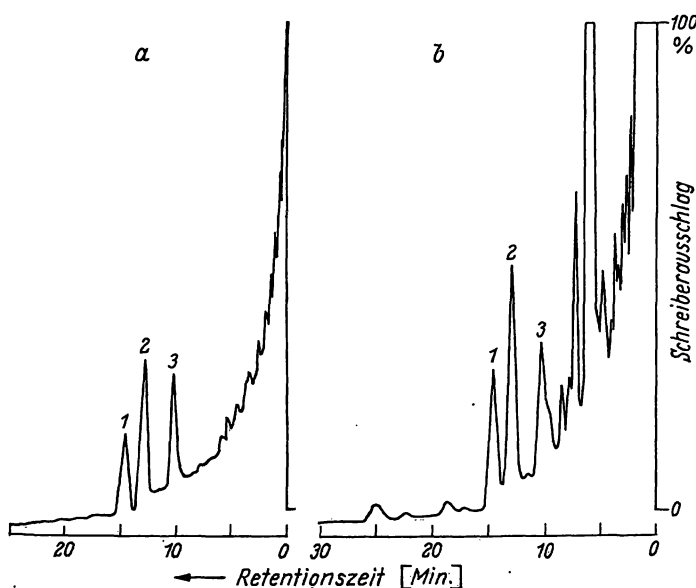


Abb. 1a

Gaschromatogramm eines Testgemisches mit Stigmasterein als internem Standard

Abb. 1b

Gaschromatogramm eines Urinextraktes mit Stigmasterein als internem Standard

(Trennbedingungen siehe Text).

- 1 = Stigmasterein
2 = Testosteron
3 = Epitestosteron

Arbeitsaufwand

Eine geübte Laborantin kann pro Woche 5 Bestimmungen durchführen.

Spezifität und Empfindlichkeit

Die Spezifität wurde massenspektrometrisch überprüft. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5 $\mu\text{g}/24$ Stdn.-Urin.

Reproduzierbarkeit und Wiederauffindungsrate

Die durchschnittliche Ausbeute von 30 Bestimmungen beträgt 81,8%. Standardabweichung und Variationskoeffizient ($n = 5$) sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird eine spezifische, empfindliche und für Routineanalysen geeignete Methode zur Bestimmung von Testosteronglucuronid im Urin beschrieben, die sich in unserer Klinik seit längerer Zeit bewährt hat. Sie eignet sich nicht nur zum Nachweis größerer Testosteronmengen bei Erwachsenen und bei endokrinen Störungen mit Virilisierung, sondern auch zur Erfassung von geringen Testosteronmengen (bis 0,5 $\mu\text{g}/24$ Stdn.), wie sie bei Patienten vor und zu Beginn der Pubertät gefunden werden. Sowohl Epitestosteron wie auch das zur Medikation verwendete Methyltestosteron interferieren bei der vorliegenden Methode nicht.

Das Interesse der pädiatrischen Endokrinologie an einer möglichst frühzeitigen Erfassung von Gonadenfunktionsstörungen hat zugenommen, seitdem bekannt ist, daß die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse schon vor der Pubertät funktionstüchtig ist und daß auch präpubertale Kinder geringe Mengen Testosteron ausscheiden.

Die älteren kolorimetrischen und fluorimetrischen Bestimmungsmethoden genügen den Anforderungen nicht mehr, weil sie zu wenig spezifisch (keine Trennung von in gleicher Konzentration vorhandenem, aber diagnostisch weniger wichtigem Epitestosteron) oder zu wenig empfindlich sind. Neuere gaschromatographische Methoden, insbesondere diejenige von SANDBERG und Mitarbeitern (7) sind zwar genügend spezifisch und empfindlich, verlangen jedoch wegen der notwendigen Gradienten-Elution einen relativ großen Arbeitsaufwand.

Es ist bekannt, daß das im Urin ausgeschiedene Testosteron nicht nur aus den Gonaden stammt, sondern auch peripher aus anderen Steroiden, insbesondere aus Dehydroepiandrosteron und Δ^4 -Androstendion, entstehen kann. Trotzdem ist es von diagnostischem Wert, Testosteron im Urin zu bestimmen, da die Testosteronausscheidung mit der Produktionsrate von Testosteron korreliert (25) und da die bestehenden Methoden zur Bestimmung von Testosteron im Plasma teils mit praktischen (gaschromatographische Methoden: relativ große Plasmamengen erforderlich), teils mit technischen (Proteinbindungsmethoden: geringe Spezifität) Schwierigkeiten verbunden sind.

Wir danken Frau C. TREBO für ihre technische Mitarbeit.

Literatur

1. SCHUBERT, K. und K. WEHRBERGER, *Naturwissenschaften* 47, 281 (1960). — 2. CAMACHO, A. M. und C. J. MIGEON, *J. Clin. Endocr. Springfield* 23, 301 (1963). — 3. FUTTERWEIT, W., N. L. McNIVEN, L. NARCUS, C. LANTOS, M. DROWDOWSKY und R. I. DORFMAN, *Steroids* 1, 628 (1963). — 4. VERMEULEN, A. und J. C. M. VERPLANCKE, *Steroids* 2, 543 (1963). — 5. BROOKS, R. V., *Steroids* 4, 117 (1964). — 6. IBAYASHI, H., M. NAKAMURA, S. MURAKAWA, T. UCHIKAWA, T. TANIOKA und K. NAKAO, *Steroids* 3, 559 (1964). — 7. SANDBERG, D. H., N. AHMAD, W. W. CLEVELAND und K. SAVARD, *Steroids* 4, 557 (1964). — 8. VOIGT, K. D., U. VOLKWEIN und J. TAMM, *Klin. Wschr.* 42, 642 (1964). — 9. LIM, N. Y. und J. F. DINGMAN, *J. Clin. Endocr., Springfield* 25, 563 (1965). — 10. PANICUCCI, F., *Androgens, Proc. 2nd Symposium on Steroid Hormones Ghent* (1965). — 11. ROSNER, J. M., N. F. CONTE, J. H. BRIGGS, P. Y. CHAO, E. M. SUDMAN und P. H. FORSHAM, *J. Clin. Endocr., Springfield* 25, 95 (1965). — 12. VAN DER MOLEN, H. J., D. GROEN, J. H. VAN DER MAAS, *Steroids* 6, 195 (1965). — 13. ZURBRÜGG, R. P., R. D. B. JACOBS und L. I. GARDNER, *J. Clin. Endocr., Springfield* 25, 315 (1965).
14. GUPTA, D. und J. GOODWIN, *Steroids* 8, 195 (1966). — 15. GRAEF, V., P. JOBST und HJ. STAUDINGER, *diese Z.* 6, 159 (1968). — 16. ISMAIL, A. A. A. und R. A. HARKNESS, *Biochem. J.* 99, 717 (1966). — 17. McROBERTS, J. W., A. D. OLSON und W. L. HERRMANN, *Clin. Chem. (New York)* 14, 565 (1968). — 18. SCHOLLBERG, K., E. SEILER und G. K. HINKEL, *Zschr. Kinderh.* 102, 341 (1968). — 19. STAJB, W. und W. HÜBNER, in (Tamm, J., Ed.) *Testosteron, Proc. Workshop Conference, Tremsbüttel* (1967), Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968). — 20. MOUTGEY, E. H., D. R. COLLINS, R. M. ROSE und J. W. MASON, *Analytic. Biochem.* 27, 343 (1969). — 21. RUDD, B. T., R. L. ROSENFELD, A. M. BONGIOVANNI und W. R. EBERLEIN, *Steroids* 13, 227 (1969). — 22. ZACHMANN, M., W. W. CLEVELAND, D. H. SANDBERG und W. L. NYHAN, *Amer. J. Dis. Child.* 112, 283 (1966). — 23. WATSON, J. T., *J. Chromatog.* 43, 339 (1969). — 24. CURTIUS, H.-CH., *diese Z.* 4, 114 (1966). — 25. VERMEULEN, A., in (Tamm, J., Ed.) *Testosteron, Proc. Workshop Conference, Tremsbüttel* (1967), Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968).

P. D. Dr. H.-Ch. Curtius
CH 8032 Zürich
Steinwiesstr. 75